

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1934

THÈSE

No 800

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

Raymond AUBERT

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Ancien Interne de l'Hôpital Pasteur

Né à Marseille, le 2 Mars 1907

LA PRÉCISION
DES NUMÉRATIONS HÉMATOLOGIQUES

CRITIQUE MATHÉMATIQUE ET RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

TRAVAIL DE L'HOPITAL PASTEUR

Président : M. FIESSINGER, Professeur

PARIS

AMÉDÉE LEGRAND, ÉDITEUR

93, BOULEVARD ST-GERMAIN, 93

1934

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1934

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

Raymond AUBERT

Ancien Externe des Hôpitaux de Paris

Ancien Interne de l'Hôpital Pasteur

Né à Marseille, le 2 Mars 1907

LA PRÉCISION

DES NUMÉRATIONS HÉMATOLOGIQUES

CRITIQUE MATHÉMATIQUE ET RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

TRAVAIL DE L'HOPITAL PASTEUR

Président : M. FIESSINGER, Professeur

PARIS

AMÉDÉE LEGRAND, ÉDITEUR

93, BOULEVARD ST-GERMAIN, 93

1934

I. — PROFESSEURS

MM.

Anatomie.....	ROUVIERE.
Anatomie médico-chirurgicale et chirurgie expérimentale.....	PROUST.
Physiologie.....	Léon BINET.
Physique médicale.....	STROHL.
Chimie médicale.....	DESGREZ.
Bactériologie.....	Robert DEBRÉ.
Parasitologie et histoire naturelle médicale.....	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales.....	BAUDOUIN.
Pathologie médicale.....	CLERC.
Pathologie chirurgicale.....	CHEVASSU.
Anatomie pathologique.....	ROUSSY.
Histologie.....	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale.....	TIFFENEAU.
Thérapeutique.....	LEPER.
Hygiène et médecine préventive.....	TANON.
Médecine légale.....	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.....	LAIGNEL-LAVASTINE
Pathologie expérimentale et comparée.....	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie.....	M. VILLARET.
Clinique médicale.....	ACHARD.
	BEZANÇON.
	CARNOT.
	Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance.....	LEREBoullet.
Clinique des maladies des enfants.....	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale ..	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux.....	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses.....	LEMIERRE.
Clinique chirurgicale.....	CUNÉO.
	GOSSET.
	GRÉGOIRE.
	LENORMANT.
Clinique ophtalmologique.....	TERRIEN.
Clinique urologique.....	MARION.
Clinique d'accouchements.....	BRINDEAU.
	COUVELAIRE.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique.....	J.-L. FAURE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.....	OMBRÉDANNE.
Clinique thérapeutique médicale.....	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique.....	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale.....	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique.....	SERGENT.
Clinique de la Tuberculose.....	Léon BERNARD.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte.....	MATHIEU.
Professeurs sans chaire.....	HOVELACQUE
	MULON.
	OLIVIER.
	VERNE.



II — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.	MM.
ALAJOUANINE.. Neurologie et Psychiâtrie.	LANTUÉJOUL .. Obstétrique.
BÉNARD (Henri). Pathologie médicale.	LAROCHE (Guy). Pathologie médicale.
BERNARD Étienne. Pathologie médicale.	LEMAIRE Pathologie expérimentale.
BOULIN Pathologie médicale.	LEVEUF Pathologie chirurgicale.
BROCQ..... Pathologie chirurgicale.	M ^{lle} J. LÉVY Pharmacologie.
BULLIARD..... Histologie.	LÉVY-VALENSI.. Neurologie et Pyschiâtrie.
CATHALA Pathologie médicale.	MOREAU Pathologie médicale.
CHABROL..... Pathologie médicale.	MOULONGUET . Pathologie chirurgicale.
CHEVALLIER .. Pathologie médicale.	MOUQUIN Pathologie médicale.
DOGNON..... Physique.	OBERLING..... Anatomie pathologique.
DONZELOT Pathologie médicale.	PETIT-DUTAILLIS. Pathologie chirurgicale.
FEY Urologie.	PIÉDELIEVRE . Médecine légale.
GALLIARD..... Parasitologie.	PORTES Obstétrique.
GASTINEL..... Bactériologie.	QUÉNU Pathologie chirurgicale.
GATELIER Pathologie chirurgicale.	RICHT Physiologie.
DE GAUDART D'ALLAINES. Pathologie chirurgicale.	SANNIÉ..... Chimie biologique.
GAYET Physiologie.	SÈNÈQUE..... Pathologie chirurgicale.
GIROUD Histologie.	SÉZARY Dermatologie et syphili- graphie.
HAGUENAU Pathologie médicale.	TROISIER Pathologie expérimentale.
HALPHEN Oto-rhino-laryngologie.	TURPIN Pathologie médicale.
HAZARD Pharmacologie.	VALLERY-RADOT
HUGUENIN Anatomie pathologique.	(Pasteur)..... Pathologia médicale
JOANNON Hygiène.	VELTER Ophtalmologie
LABBÉ (Henri)... Chimie biologique.	VIGNES Obstétrique.
LACOMME Obstétrique.	WILMOTH Pathologie chirurgicale.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

pour le service des examens

MM.	MM.
ALGLAVE Pathologie chirurgicale.	LEROUX..... Anatomie pathologique.
BUSQUET Pharmacologie.	NEVEU-LEMAIRE Parasitologie.
CHAILLEY-BERT. Physiologie.	ZIMMERN..... Physique.

IV — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

à titre permanent.

MM.		MM.	
ABRAMI	} Clinique médicale.	ECALLE	} Clinique obstétricale.
AUBERTIN.....		GUÉNIOT	
BRULE		LELORIER	
CHIRAY		LÉVY-SOLAL ...	
DUVOIR		METZGER	
HARVIER.....			
LIAN			
MM.			
BASSET	} Clinique chirurgicale.		
CADENAT.....			
HEITZ-BOYER. .			
MOCQUOT			
MOURE.....			
SCHWARTZ.....			

V. — CHARGÉS DE COURS

MM.	
CHAILLEY-BERT, agrégé	Éducation physique.
FREY.	Stomatologie.
LEDoux-LEBARD	Radiologie clinique.
WEIL-HALLÉ.....	Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

LE DOCTEUR PAUL AUBERT

Ancien Médecin-Major des Troupes coloniales
Ancien Directeur de l'Institut Pasteur de Brazzaville

A MA MÈRE

A MA FEMME

A MES ENFANTS

A MES PARENTS

A MES AMIS

A MONSIEUR LE DOCTEUR E. ROUX (*in memoriam*)

Directeur de l'Institut Pasteur

A MONSIEUR LE DOCTEUR LOUIS MARTIN

Directeur de l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie de Médecine

*Témoignage de notre profond
respect et de notre gratitude.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR N. FIESSINGER

Professeur de Pathologie expérimentale et comparée

Médecin des Hôpitaux

Chevalier de la Légion d'Honneur

*Qui nous a fait le grand honneur
de bien vouloir présider notre thèse.
Hommages respectueux.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR A. BOCAGE

Médecin de l'Hôpital Pasteur

Ancien Chef de Clinique à la Faculté

Qui non seulement nous a inspiré le sujet de cette thèse, nous a guidé journellement mais encore a été pour nous un Maître à la bienveillance inlassable, amicale et dévouée. En témoignage de notre profonde reconnaissance.

A MONSIEUR LE DOCTEUR RENÉ MARTIN

Médecin de l'Hôpital Pasteur

A NOS MAÎTRES DE L'INSTITUT PASTEUR

MONSIEUR LE PROFESSEUR MARCHOUX

MONSIEUR LE DOCTEUR G. LOISEAU

MONSIEUR LE DOCTEUR A. SALIMBENI

A NOS MAITRES DE LA FACULTÉ DE PARIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR H. ROUVIÈRE

Remerciements pour sa bienveillance.

A NOS MAITRES DANS LES HOPITAUX

Stage

MONSIEUR LE DOCTEUR F. RAMOND

MONSIEUR LE PROFESSEUR NOBÉCOURT

MONSIEUR LE PROFESSEUR GUILLAIN

MONSIEUR LE DOCTEUR V. CATHALA

Externat

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ P. MOCQUOT

MONSIEUR LE DOCTEUR P. RAVAUT

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ J. TROISIÈRE

MONSIEUR LE DOCTEUR R. GOUVERNEUR

A CEUX QUI ONT ÉTÉ POUR NOUS DES
CONSEILLERS DÉVOUÉS

DOCTEUR F. HECKENROTH

Médecin général
Professeur à la Faculté de Marseille

PROFESSEUR F. MESNIL

De l'Institut Pasteur
Membre de l'Académie

DOCTEUR E. JEANBRAU

Professeur à la Faculté de Montpellier

DOCTEUR P. CABOUAT

Chirurgien des Hôpitaux de Mines
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris

AUX MÉDECINS, CHIRURGIENS, ASSISTANTS,
INTERNES DES HOPITAUX QUI ONT CON-
TRIBUÉ A NOTRE FORMATION MÉDICALE.

*Qu'ils trouvent ici nos remer-
ciements.*

INTRODUCTION

De plus en plus les médecins prennent l'habitude d'introduire des valeurs numériques dans les résultats de leurs examens.

Quand on sait combien sont fragiles la plupart des méthodes d'analyse biologique, on ne saurait soumettre à une critique trop sévère, cette tendance actuelle.

C'est l'Hématologie où la précision apparente de ces mesures, est la plus frappante, puisqu'elle porte sur des nombres de sept chiffres.

Quelle en est la valeur, la signification, c'est ce que nous avons essayé de préciser dans le présent travail ; car il faut bien l'avouer, les Traités classiques, et les manuel d'hématologie, en France au moins, sont à peu près tous muets sur ce point.

Si quelques-uns en soupçonnent l'imprécision, aucun ne fixe la grandeur de l'erreur dont sont entachés les résultats.

Le problème est beaucoup plus complexe qu'il n'apparaît à première vue, car nous verrons, qu'à

côté des erreurs tenant aux inégalités des instruments employés, aux petites maladresses inévitables de l'opérateur, tant dans l'exécution que dans le dénombrement des éléments examinés : il existe un facteur important, déterminant des différences entre les résultats de deux numérations d'un même échantillon de sang, qui tient à :

« L'irrégularité de répartition des globules rouges sur la cellule. »

Irrégularité inévitable, disons presque obligatoire, due à ce qu'il s'agit d'une suspension dans un liquide, de particules solides, que rien n'oblige à se tenir à égales distances les unes des autres — contrairement à ce qui peut se passer dans une solution de substance chimique, dont théoriquement au moins, les molécules tendent à se répartir régulièrement.

Ces inégalités de répartition, prévisibles *a priori*, nous avons essayé d'en démontrer l'existence, d'en préciser la grandeur.

Et, pour éliminer tous autres facteurs pouvant les déterminer, nous nous sommes astreints à opérer sur une même goutte de dilution sanguine.

Bien entendu, en dehors des inégalités de répartition, trouvées à l'intérieur de la goutte étudiée, il en existe encore d'autres entre les différentes gouttes de la dilution faite avec un même échantillon de sang du malade.

Nous saisissons donc, qu'à côté des erreurs de mesure d'ordre purement technique, il existe en héma-

tologie un autre facteur d'incertitude des résultats énoncés qui est :

« L'inégalité de répartition physique des globules rouges sur la cellule hématimétrique,

et qui fait que le nombre trouvé est plus ou moins probable, mais jamais absolument certain. »

Une certitude absolue ne pourrait être obtenue que par le dénombrement réel de tous les globules rouges contenus dans le volume de sang prélevé.

La nécessité où nous sommes de n'opérer que sur un petit échantillon d'une dilution de ce sang donne une énorme importance au hasard de la distribution des globules rouges sur la cellule hématimétrique et introduit un facteur de probabilité.

Facteur dont on doit obligatoirement donner la valeur, avec le résultat de la mesure, comme l'on doit à côté de ceux-ci indiquer aussi la précision de la mesure.

L'erreur sur la mesure, et la probabilité d'exactitude de cette mesure, étant deux notions absolument distinctes — liées par des lois mathématiques complexes que donnent l'étude du calcul des probabilités.

Nos expériences nous ont montré que les lois du hasard, telles qu'elle sont définies par les mathématiciens s'appliquent intégralement en matière de numérations des globules rouges.

Ces recherches nous ont permis en outre de fixer les limites d'exactitude des techniques de numération habituellement employées.

On trouvera dans le présent travail.

1^o Une étude générale des méthodes de numérations globulaires classiques, de la précision qu'on leur reconnaît.

2^o Un chapitre expliquant la différence qu'il y a entre la précision d'une mesure, et sa probabilité d'exactitude, notions plus familières aux mathématiciens qu'aux médecins et qu'il convient de bien distinguer l'une de l'autre.

3^o Une étude des causes d'erreurs connues.

4^o La description de notre appareillage et de notre technique d'expérimentation personnelle.

5^o Les résultats que nous ont donné cette méthode, leur discussion théorique.

6^o Les conséquences pratiques que l'on peut en tirer.

Nous tenons à remercier vivement dès le début de ce travail le Docteur René MARTIN de l'Hôpital Pasteur, qui nous a toujours témoigné, et, particulièrement pendant la durée de notre internat, une bienveillante attention. L'organisation générale de ses services nous a permis de travailler dans d'excellentes conditions.

Notre reconnaissance est assurée au Docteur G. LOISEAU et à M. R. VEILLON chimiste, pour l'aide apportée au cours de ce travail.

Nous prions M. H. LAUGIER titulaire de la chaire de Physiologie du Travail au conservatoire national des Arts et Métiers, ainsi que ses collaborateurs.

MADAME ET M. FESSARD. Directeur Adjoint à l'École des Hautes Études, qui ont bien voulu, préciser et contrôler les chapitres relatifs à la probabilité des mesures effectives, de trouver ici, l'expression de notre gratitude pour leur grande complaisance.

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS

A. — Historique

Deux méthodes générales de numération globulaire se présentent :

Les unes dites Directes, consistent à compter le nombre de globules rouges renfermés dans un certain volume de sang.

Les autres Indirectes se basent sur certains caractères dépendant, des globules rouges, tels : leur coloration — méthodes colorimétriques, leur volume — méthode de l'hématocrite, l'opacité d'une dilution de globules rouges appréciée par un photomètre.

On peut faire à toutes ces méthodes indirectes le reproche commun de supposer que le globule rouge est une entité intangible dans ses caractères physiques et chimiques, or il est loin d'en être toujours ainsi. Mais il est bien entendu par ailleurs que ces mêmes procédés, tout à fait imprécis en ce qui concerne le nombre des globules rouges, peuvent fournir, par comparaison avec celui-ci, des résultats intéressants sur certains caractères hématologiques. : teneur en hémoglobine, volume des globules rouges etc.

Les méthodes dites Directes, sont à l'abri de ces reproches, puisque théoriquement tout au moins, elles consistent à numérer le nombre de globules rouges renfermés dans un volume donné, de sang. En réalité ces conditions ne sont pas remplies dans la pratique actuellement adoptée pour les numérations globulaires (voir plus loin la méthode de VIERORDT).

Nous tenons en effet à signaler immédiatement qu'il n'existe pas à notre connaissance, de méthode vraiment directe, ou la numération globulaire soit faite sur du sang pur.

Seule une méthode méritant ce nom, a été utilisée par un auteur Anglais au sujet des leucocytes (D. THOMSON).

Toutes les autres méthodes groupées sous le nom de Méthodes directes de Numération, ont en effet pour principe commun d'opérer avec des dilutions de sang.

Aussi nous les appellerons *méthodes directes sur sang dilué*. Elles consistent à dénombrer exactement « le nombre de globules rouges contenus dans un volume donné d'un mélange exactement titré et parfaitement homogène, de sang et de liquide de dilution, et de rapporter ce chiffre au mm^3 de sang pur ».

Cette distinction entre ces deux Méthodes générales pourrait paraître oiseuse, elle est pourtant capitale, nous verrons plus loin les conséquences importantes qui résultent de ce fait :

Diluer du sang pour en rénumérer les globules rouges.

Ce point fixé, si l'on essaye de retrouver les premières tentatives faites pour numérer les globules rouges on est frappé de ne voir apparaître les expériences initiales que vers 1840.

C'est PIORRY qui paraît avoir le premier pressenti la solution de ce problème ; dans son traité de Médecine Pratique datant de 1847, il propose « de diluer quelques gouttes de sang, au moyen d'un liquide ne dissolvant pas les globules et d'apprécier les proportions relatives des divers globules ». Mais cette idée ne fut pas suivie de réalisation pratique.

Plus tard, VIERORDT en 1852 décrit la Méthode suivante : « prélever un volume donné de sang pur, $0,1 \text{ mm}^3$ le diluer dans l'eau albumineuse, étendre le mélange en fines lignes et compter — la totalité — des globules rouges qui s'y trouvait ». Cette méthode est très longue et très délicate ; nécessité de compter de deux à trois mille éléments et observation au microscope d'une durée d'une heure, aussi n'a-t-elle pas été utilisée en pratique ; il faut pourtant noter qu'elle constitue vraiment une méthode directe sur sang pur. La dilution n'est ici qu'un artifice, puisque l'on examine la totalité du volume du sang pur prélevé.

Enfin la méthode CRAMER en 1855 paraît être vraiment la base des méthodes actuelles.

Elle consiste à préparer un mélange titré au moyen de deux pipettes. A le brasser et à l'introduire dans une chambre de numération de hauteur connue, les surfaces examinées sont évaluées au moyen d'un micromètre oculaire.

Ce sont des difficultés de construction qui semblent s'être opposées à sa vulgarisation.

La méthode de MANTEGAZZA n'apporte aucun perfectionnement. C'est en France en 1867 que POTAIN crée un instrument, toujours utilisé depuis lors, et bien connu si ce n'est sous ce nom : le Mélangeur de POTAIN, qui permet de réaliser une dilution exactement titrée et de l'agiter.

La méthode de POTAIN consiste à numérer un volume exactement repéré de la dilution de sang, en disposant de fines gouttelettes sur une lame, chaque gouttelette devant être comprise dans un seul champ microscopique, elle est d'une application extrêmement délicate.

HAYEM de 1875 à 1877 décrit la méthode qui porte son nom, elle réalise comme dans la méthode de CRAMER un mélange titré au moyen de deux pipettes, — l'introduit dans une cellule de hauteur donnée — sur laquelle se projette, (réalisation de NACHET 1877) un quadrillage de $1/25$ de mm^2 . Son utilisation entraîne des calculs inutiles, en raison de son mode de graduation et du titre des dilutions obtenues.

MALASSEZ, en novembre 1872 reprenant la méthode de POTAIN, avait dans un premier travail proposé le dispositif suivant :

Réaliser au moyen du mélangeur de POTAIN une dilution titrée, en aspirer une partie dans un capillaire dont le volume est connu, puis numérer à l'aide d'un oculaire-quadrillé le nombre de globules rouges renfermés dans une longueur donnée de ce capillaire.

Cette méthode bien plus précise que les méthodes antérieures, avait cependant l'inconvénient de nécessiter encore des mensurations micrométriques.

Aussi depuis cette description initiale MALLASSEZ a fait construire un compte-globule très pratique.

Il comprend un mélangeur de POTAÏN, une chambre de numération, prototype des cellules modernes.

La particularité intéressante de cette chambre réside d'une part dans son compresseur, il lui assure une hauteur constante, uniforme et invariable de $1/5$ de mm., ce dispositif est d'une grande sécurité, bien supérieure à ceux où la lamelle repose par la seule pesanteur.

D'autre part dans son quadrillage tracé directement au diamant, avec une machine automatique à diviser (STIASSNIE).

Ce quadrillage comprend 100 rectnagles d'une surface de $1/20$ de mm² dont certains sont subdivisés en 20 carrés élémentaires.

Chacun de ces rectangles renferme donc $1/100$ de mm³ de dilution.

L'introduction d'un quadrillage direct de la cellule est un perfectionnement intéressant, et dispense de toute mensuration microscopique, et les calculs nécessaires sont ici très simples.

B. — Les Méthodes actuelles de numération globulaire directes sur sang dilué

Leur principe commun a déjà été exposé plus haut, elles ne diffèrent entre elles (HAYEM-MA-

LASSEZ-THOMA, A. LAFONT, N. FIESSINGER, etc.), que par des détails de construction et de coefficients de calculs.

Nous avons personnellement utilisé celle du D^r MALASSEZ, qui donne le plus de sécurité quant aux instruments, mais nous ne rappellerons pas le détail des opérations successives parfaitement décrites dans les manuels.

C. — Ce que l'on sait de la précision des numérations globulaires

Nous avons recherché dans la littérature ce qui avait été fait dans ce domaine. La note sur la méthode de CRAMER, 1855, cite un chiffre de précision : 1,6 %, sans autres explications.

C'est MALLASSEZ, dans son travail de 1872 qui présente et discute le problème par rapport à sa méthode du tube capillaire (voir historique), voici ses conclusions :

1^o Les erreurs de numération elles-mêmes, c'est-à-dire de décompte des globules rouges à l'œil sont inférieures à 3 %, à condition que la dilution soit telle, qu'il y ait ou plus de 5 globules rouges par carré élémentaire.

(N.^oB. Cette condition correspond, avec la méthode actuelle du D^r MALLASSEZ, à une dilution au 1/400.)

2^o « Malgré toutes ces précautions, les chiffres obtenus ne sont pas toujours les mêmes dans plusieurs numérations faites en divers points du tube, on peut

trouver des différences de 1-2, rarement plus, par chaque centaine de globules, ce sont là des erreurs inévitables.

Il en résulte que si, dans une observation, nous trouvons, en comptant en deux points du capillaire, des différences plus grandes que ces chiffres, nous aurons la preuve immédiate que les manœuvres avaient été mal exécutées, et il faudra recommencer. »

3^o En faisant plusieurs numérations avec le même mélange et le même capillaire, les différences de numération ne doivent pas dépasser 2 %.

Les conclusions de MALLASSEZ sont donc formelles : les erreurs existent, elles ne doivent pas dépasser 1 ou 2 % en comptant la même goutte d'une même dilution, s'il n'en est pas ainsi il y a erreur de technique.

Nous verrons plus loin ce qu'il faut penser de cette opinion.

HAYEM dans son exposé loue la précision de sa méthode, mais sans chiffres à l'appui.

Enfin, dans la littérature moderne, signalons le chapitre du Précis de microscopie de LANGERON, où il pose nettement le problème, donne des conseils judicieux, constate l'existence de grosses erreurs, qu'il attribue uniquement à des fautes de technique. Opinion trop exclusive à notre avis.

Dans la littérature de langue anglaise, existe un très intéressant mémoire rédigé par ROSS et STOR, sur les erreurs statistiques, travail très documenté utile

aux biologistes et aux médecins, mais il envisage selon nous, le problème des numérations globulaires, d'un côté purement mathématique sans tenir compte des conditions des expériences biologiques.

Citons encore un article de NEWHAM et HARVEY, où les causes d'erreurs sont envisagées, surtout au point de vue construction des pipettes et des cellules.

Ces auteurs donnent le conseil, qu'ils reconnaissent eux-mêmes erroné, de compter tous les carrés de la cellule de BUCKER, pour tenter de corriger le manque de régularité de l'émulsion globulaire, et ils signalent que cette cause d'erreur est indépendante du matériel.

Pour eux, la dilution au 1/100 est préférable à celle au 1/200 et ils admettent que les N. de globules rouges sont faites avec une erreur de 100.000 globules rouges en plus ou en moins.

Tels sont les éléments que nous avons pu recueillir au point de vue bibliographique.

Nous avons alors tenté une enquête auprès des personnes habituées à utiliser les résultats des numérations globulaires et nous avons recueilli des avis contradictoires.

Pour les uns, il y aurait une précision presque absolue, de l'ordre de 20 à 50.000 globules rouges, ainsi qu'en témoignent leurs conclusions tenant compte de variations ne dépassant pas ces chiffres.

Pour les autres, ils ont donné à notre question, une réponse évasive.

On a proposé ainsi de ne tenir pour exact qu'un

nombre de globules rouges retrouvé le même à 100.000 unités près en plus ou en moins, à deux examens successifs faits à 48 heures d'intervalle.

Mais, il est un fait général à noter : un opérateur donné, a, de la méthode qu'il utilise, une confiance qui augmente au fur et à mesure qu'il la possède mieux. Aussi, les grosses variations qu'il observe, le frappent surtout au début, et plus tard, en raison de cette confiance intuitive en la méthode, et de la rareté de ces grosses erreurs, il les attribue à tort à une faute de technique.

Enfin, nous rapportons l'opinion de BOCAGE, orienté par une longue pratique de l'étude des variations des éléments du sang ; et dont les résultats acquis alors, mais non publiés, aboutissaient aux conclusions suivantes :

Dans la moitié des expériences, l'erreur maxima, est de l'ordre de 18 %, soit environ de 800.000 globules rouges en plus ou en moins sur un sang renfermant 4.500.000 globules rouges.

Dans l'autre moitié des expériences, on ne connaît pas la valeur de l'erreur maxima.

Cette incertitude, et l'imprécision des résultats dépendant essentiellement d'un facteur, qui n'avait pas été suffisamment mis en évidence jusqu'ici : *l'irrégularité de répartition des globules rouges sur la cellule hématimétrique.*

De ces quelques notes, se dégagent donc deux tendances générales.

D'une part, MALLASSEZ, LANGERON, et certains

auteurs modernes, imputent le manque de précision des numérations globulaires aux *seules fautes de technique*.

D'autre part, BOCAGE fait intervenir *la notion d'irrégularité de répartition des globules rouges sur la cellule*. Ce fait oblige à considérer, à côté de la précision de la mesure, les chances que cette mesure a, de correspondre à la réalité, en un mot, sa probabilité d'exactitude.

Et c'est sur ses indications que nous avons apporté d'autres expériences faites par la méthode photographique, qui élimine toute cause d'erreur personnelle à l'opérateur.

Ces résultats confrontés avec les calculs des probabilités, interprétés à leur lumière, et soumis au contrôle de statisticiens rompus aux problèmes biologiques, nous ont permis de montrer que le rôle joué par le hasard de répartition des hématies est très important par rapports aux autres causes d'erreur.

CHAPITRE II

PRÉCISION ET PROBABILITÉ D'EXACTITUDE DES NUMÉRATIONS HÉMATOLOGIQUES.

Avant d'aborder l'exposé de nos recherches expérimentales, nous voudrions rappeler quelques notions théoriques au sujet de la précision des mesures en général et de celles des numérations hématologiques en particulier.

En physique quand une méthode de mesure est correcte, la précision de son résultat est uniquement fonction de la qualité des instruments employés et de la rigueur des observations faites.

On indique cette précision en mentionnant la grandeur de l'erreur maxima en plus ou en moins, qui a pu être commise, donnée tantôt en valeur absolue avec les unités employées pour la mesure, tantôt en valeur relative évaluée en fraction ou pour cent.

Chaque fois qu'une mesure porte sur la totalité de l'objet à étudier ou sur un échantillon d'une substance rigoureusement homogène, le résultat obtenu est d'une certitude absolue, c'est-à-dire que la grandeur réelle de ce qu'on mesure ne s'écarte sûrement pas du résultat

obtenu d'une quantité plus grande que la valeur de l'erreur expérimentale.

C'est le cas de la plupart des mensurations de propriétés physiques et des dosages de substances chimiques.

Il n'en est pas du tout ainsi en matière de numérations hématologiques, qui ne leur sont assimilables en rien, car elles portent sur des suspensions globulaires qui ne sont pas des substances parfaitement homogènes.

Une numération hématologique est une opération de dénombrement statistique d'éléments dispersés dans une enceinte sans que rien les oblige à se tenir à égales distances les uns des autres.

La rigueur du décompte fait sur la parcelle examinée n'implique pas que son résultat soit valable pour l'ensemble.

Il y a bien, dans une numération, des mesures de volumes et un dénombrement dont les erreurs relatives s'additionnent pour faire l'erreur relative sur le résultat, comme cela se passe dans un dosage chimique. *Mais en plus de ces erreurs d'ordre purement technique, expérimental ou opératoire, comme il vous plaira de les appeler, — à côté d'elles il y a une source supplémentaire d'incertitude sur la signification du résultat qui est liée aux irrégularités de répartition des globules dans la dilution sanguine.*

La numération ne portant que sur un petit échantillon de cette dilution, rien ne nous permet de savoir *a priori* si le nombre des globules contenus dans

l'échantillon étudié est très voisin où très éloigné de la composition moyenne de l'ensemble ; il nous donne une indication de probabilité, mais rien de plus.

Quelque soin que nous apportions à l'examen d'un millimètre cube de la dilution sanguine, nous ne modifions en rien l'incertitude où nous sommes au sujet de la teneur en globules de la totalité de la dilution, c'est-à-dire de la goutte de sang prélevée sur le malade.

On peut même prévoir que, pour un même effort de travail, on sera mieux renseigné à ce sujet par des numérations de précision médiocre d'échantillons nombreux, que par la numération rigoureusement exacte d'un seul échantillon.

Il n'est permis, de l'étude d'un seul échantillon, de conclure pour l'ensemble que si on connaît approximativement la loi de répartition des globules dans la dilution ? Faute de l'avoir déterminée au préalable, les résultats obtenus auront à peu près la valeur de l'observation de cet anglais légendaire qui, débarquant à Boulogne notait à la vue de la première femme rencontrée : « Toutes les françaises sont rousses ». Nous nous excusons de la trivialité de cet exemple, mais il nous fait toucher du doigt la distinction qu'il importe de faire entre la précision d'une observation et la probabilité d'exactitude, de vérité, du résultat qu'elle donne.

En hématologie, comme dans toute statistique, aux erreurs techniques, opératoires, tenant aux instruments et à l'opérateur, s'ajoutent des « erreurs statistiques »

dues à l'irrégularité de la répartition des globules sanguins dans la mélange de dilution.

Quelle est l'importance de ces erreurs statistiques inévitables ? Quelle est la fréquence de chacun des taux qu'elles peuvent atteindre ? C'est le problème que nous nous sommes attaché à résoudre, dont l'importance nous a été bien montrée par Bocage, et qui, croyons-nous, n'a jamais été sérieusement abordée auparavant.

Nous verrons qu'elles ne sont pas négligeables, puisqu'elles peuvent atteindre largement la valeur des erreurs d'ordre purement opératoire, et nous montrerons qu'elles obéissent aux lois du hasard, telles que les prévoit la théorie mathématique des probabilités.

Nous démontrerons aussi que seules sont valables des numérations globulaires précisant à la fois la probabilité et la précision du résultat, cette précision elle-même subordonnée à deux facteurs distincts, l'erreur opératoire et l'erreur statistique.

Non seulement on n'a pas le droit de comparer entre eux des résultats numériques quand on ne sait pas combien de chiffres exacts ils comportent, mais il n'est pas possible d'utiliser valablement des résultats dont la probabilité d'exactitude est totalement inconnue. Que signifie l'écart entre deux résultats de numération de globules rouges si nous savons que l'inexactitude du premier a une chance sur deux d'être inférieure à dix pour cent et que celle du second ne dépasse vingt pour cent qu'une fois sur quatre. Des résultats hétérogènes ne peuvent se comparer utilement.

Notez bien que nous ne nous demandons pas, dans un esprit de haute spéculation philosophique, si le sang prélevé au doigt du malade est identique à celui qui circule dans le reste de son organisme. La question que nous cherchons à résoudre est beaucoup plus étroitement limitée. Elle se pose ainsi :

Quand, dans un champ de l'hématimètre nous avons compté un certain nombre de globules rouges, quel chiffre aurions-nous trouvé si nous avions compté un autre champ ?

Quelles sont les valeurs moyennes et les valeurs extrêmes qu'on peut ainsi trouver pour un même échantillon de dilution sanguine ? (étant entendu qu'on opère sur une cellule dont tous les éléments volumétriques sont rigoureusement égaux).

Sur combien de champs devons-nous établir la moyenne dont nous déduirons le nombre des globules rouges contenus par millimètres cube de la goutte du sang prélevé ?

Quelle est la grandeur des erreurs dues aux imperfections du matériel et de l'opération technique ?

Quelle est la grandeur de l'erreur statistique due aux irrégularités inévitables de répartition des globules sur le quadrillage de l'hématimètre ?

Quelle est la probabilité du résultat, ou autrement dit, combien y a-t-il de chances pour cent que le résultat trouvé soit vrai, c'est-à-dire que le nombre réel des globules ne diffère pas du nombre trouvé d'une quantité supérieure à la valeur des erreurs ainsi établies ?

Avant d'étudier les différentes erreurs, il nous paraît important de préciser quelques définitions de termes utilisés dans le contrôle des expériences et dans le calcul des probabilités.

L'erreur absolue d'une mesure est la valeur e dont la mesure diffère ou par excès ou par défaut, du nombre exact G .

Ainsi, une longueur mesurée avec une règle graduée en $1/2$ millimètre est exacte à $1/2$ millimètre près en plus ou en moins ;

et 0,5 mm. en est le chiffre de l'erreur absolue.

L'erreur relative est le rapport entre l'erreur absolue et la mesure trouvée. On est obligé d'introduire cette valeur, car l'erreur absolue ne signifie rien par elle-même ; en effet, si l'on mesure avec un pied à coulisse donnant le 0,1 de mm. le diamètre d'une sphère de 50 millimètres et celui d'un axe de montre de 0,2 mm., on a la même erreur absolue de 0,1 mm. Mais alors que dans le 1^{er} cas, l'erreur relative est de $\frac{0,1}{50} = \frac{1}{500}$ c'est-à-dire très faible ;

Dans le 2^e, elle est de $\frac{0,1}{0,2} = 1/2$, c'est-à-dire bien trop forte.

On voit ainsi qu'il faut approprier la précision des instruments à la taille des mesures.

Nous n'insisterons pas sur le calcul de la moyenne arithmétique d'une série de mesures. Mais nous ferons seulement observer, que l'on est fondé à considérer cette moyenne M , comme le chiffre le plus probable d'une série de mesures, à condition que les faits

étudiés obéissent aux lois du hasard, c'est le cas des chiffres correspondant à la répartition des globules rouges dans une dilution, voir à ce sujet l'étude du groupement des valeurs (conclusions).

Il est intéressant de comparer par rapport à cette moyenne les diverses mesures effectuées, on obtient ainsi les écarts à la moyenne entre $n_1, n_2, n_3 \dots n_n$ et M dont la valeur algébrique en positive (si la mesure est plus grande que la moyenne, négative dans le cas contraire).

Le calcul des écarts à la moyenne est d'un usage fréquent.

On conçoit, en effet, qu'un ensemble de mesures, se rapportant à une même expérience, sera d'autant plus régulier, ou homogène, que la série des écarts à la moyenne sera plus faible; c'est pour objectiver cette tendance générale de l'expérience que l'on introduit la notion de dispersion des mesures désignée par σ (sigma)

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(n - M)^2}{N}}.$$

c'est-à-dire la racine carré du quotient de la somme des carrés des écarts à la moyenne par le nombre des mesures effectuées.

De la valeur σ découle une autre valeur très importante, c'est celle de l'écart probable fait sur une mesure, écart que l'on dépasse obligatoirement dans 50 cas sur 100 :

l'écart probable $ep = 0,6745 \sigma$

Conditions nécessaires pour pouvoir valablement conclure à une différence réelle entre les nombres de globules de deux échantillons de sang :

Il faut que la différence entre les chiffres trouvés soit plus grande que la somme des erreurs commises sur chacun d'eux.

Bien entendu les deux résultats comparés doivent avoir la même probabilité, qui sera aussi celle que l'on tire de leur comparaison.

Après avoir donné ces définitions nous en arrivons à l'étude des causes d'erreur.

CHAPITRE III

LES ERREURS

De multiples causes d'erreurs s'introduisent dans une opération de numération globulaire et on peut les grouper en trois classes :

- les unes dépendant de la construction des appareils ;
- les autres du mode opératoire :
- la dernière enfin, est *indépendante du matériel et de l'opérateur*.

1° Les erreurs relevant de la construction des appareils

Elles sont très faibles en s'adressant à des constructeurs éprouvés.

Voici les chiffres correspondants au compte globule du Dr MALASSEZ, qui nous ont été donnés par M. STIASSNIE, que nous tenons à remercier ici.

— L'erreur relative ‰ sur le volume de la chambre est inférieure à 2,5 ‰.

— Les lamelles spéciales n'introduisent pas de causes d'erreur.

— La graduation des pipettes de dilution par

jaugeage au mercure, comporte une erreur de l'ordre de 3 %.

On voit donc au total que les erreurs de construction peuvent être très faibles, environ 5 %. Mais il faut faire contrôler les hématimètres de temps en temps, bonne précaution surtout en cas de chute de l'appareil, ou d'oxydation des « vis calantes ».

2° Les erreurs d'exécution des opérations

Nous inspirant du précis de LANGERON, où ces détails sont minutieusement exposés, nous envisagerons :

D'abord l'état du matériel — qui doit être propre — et SEC — ce dernier point est important surtout pour les pipettes.

Et ensuite, les différents actes :

— l'aspiration du sang et du liquide de dilution sont des temps importants, il faut réaliser un affleurement exact des colonnes liquides, par rapport aux repères choisis, une opération faite soigneusement n'entraîne au plus qu'une erreur de 0,01 % ;

— la préparation à l'agitation, nécessite l'enlèvement du caoutchouc d'aspiration et la prise de la pipette, par ses extrémités, entre le pouce et le majeur ;

— l'agitation elle-même doit être bien plus longue que ne le disent les manuels, c'est un temps capital dont résultera l'homogénéité (relative d'ailleurs)

de la suspension de globules. Ce temps demande au moins deux minutes ;

— la mise en place de la goutte examinée doit être rapide, et le temps de sédimentation des globules rouges — le microscope étant bien horizontal — demande cinq à dix minutes (éclairage éteint).

— enfin, intervient le décompte des globules rouges, où la fatigue de l'observateur joue un rôle que nous discuterons, après avoir comparé entre elles, les numérations à l'œil, et celles faites avec le contrôle photographique.

3^o La troisième classe d'erreur est d'ordre physique indépendante du matériel et de l'opérateur

C'est en étudiant seulement, les chiffres se rapportant à l'examen d'une seule goutte de dilution, placée dans la cellule hématimétrique, et en contrôlant la numération par l'enregistrement photographique, que l'on met cette cause en évidence.

On conçoit alors que les variations dans la série des nombres observés provient uniquement de l'irrégularité de répartition des globules rouges sur cette cellule.

Pour comprendre la nature de cette irrégularité, de répartition, il faut analyser ce qu'est une dilution d'hématies.

Le mélange de sang et d'un liquide tel que le Marciano, ne constitue pas une dilution, au sens chimique du mot, dans laquelle les globules rouges joueraient

le rôle du corps dissous, et le liquide celui du solvant, mais « c'est une suspension hétérogène de corpuscules solides répartis au hasard dans un liquide moins dense ; d'autre part, c'est une suspension que l'on laisse obligatoirement sédimenter avant de la numérer ».

On peut donc être sûr, *a priori*, qu'il existera des irrégularités de répartition, et cela, d'autant plus que le mélange aura été fait moins soigneusement, c'est-à-dire moins agité.

Cette irrégularité de répartition est évidente dans certains cas, tels ceux d'auto-agglutination des hématies, rendant impossible toute numération. Mais dans d'autres cas, elle n'apparaît pas de prime abord.

Aussi n'est-il pas impossible, que même avec une émulsion faite très soigneusement, avec un sang normal, sans phénomènes d'auto-agglutination, il n'en persiste pas moins quelques irrégularités de répartition.

C'est ce que nous avons cherché à établir dans le présent travail, afin de savoir ce que l'on peut demander aux numérations globulaires exécutées avec les méthodes classiques, et s'il n'est pas possible, avec une technique meilleure d'obtenir une précision et une probabilité accrue.

CHAPITRE IV

EXPÉRIMENTATION PERSONNELLE

Des discussions qui précèdent, il ressort, qu'il manque à l'heure actuelle aux hématologistes une étude expérimentale de la manière dont se répartissent les globules rouges dans les dilutions sanguines sur lesquelles se font habituellement les numérations.

Cette étude, pour avoir une valeur en vue du calcul des probabilités, doit être faite sur des échantillons très nombreux, 100 ou davantage d'une *même dilution*, examinée dans un temps aussi court que possible.

C'est dire qu'il n'est pas permis d'espérer y arriver par la méthode d'observation visuelle habituellement employée pour les numérations hématologiques.

L'examen d'une centaine de champs de l'hématimètre pouvant demander plusieurs heures ; pendant lesquelles la dessication lente, les courants liquidiens modifient la répartition des globules.

Il faut compter en outre, avec la fatigue de l'opérateur, dont les erreurs de dénombrements finiront par prendre une importance exagérée qui

risque d'invalider les déductions que l'on voudrait tirer de ces observations.

C'est pourquoi, il nous a paru indispensable d'employer une méthode photographique, qui permet de fixer dans un temps très court la répartition des hématies sur la cellule hématimétrique. Les numérations devant être faites à tête reposée, par pointage au crayon, des bandes photographiques, opération qui peut être répétée plusieurs fois sur chaque image, et donne ainsi pour chacune un résultat exact à une unité près. (Alors que, nous le verrons plus loin, la méthode visuelle donne dans les mêmes conditions des erreurs de 5 à 15 fois plus grandes).

Appareillage

Nous avons réalisé et mis au point nous-mêmes le dispositif suivant ; qui permet de photographier rapidement toute la surface d'une cellule de MALASSEZ, renfermant la dilution de sang à étudier, en ayant un contrôle simultané et constant de l'image photographiée, au moyen d'un oculaire associé.

Réalisation : sur un socle commun sont fixés : un microscope ; un support de chambre photographique ; une lanterne d'éclairage à condensateur et son transformateur d'alimentation.

Le microscope porte à la place de l'oculaire, un dispositif dit « T-optique » la petite branche du T s'adapte à la place de l'oculaire, l'oculaire étant reporté à l'autre extrémité de cette même branche, et

l'observateur regardant dans la grande branche du T, suit, au moyen de l'oculaire associé qui s'y trouve l'image se formant sur le verre dépoli (ou sur l'émulsion photographique).

Les rapports entre les deux oculaires et le centre du T optique sont calculés et réalisés de façon à ce qu'il y ait simultanité de mise au point, entre l'image observée à l'œil et l'image réelle qui se forme sur le verre dépoli, ou sur l'émulsion sensible.

La chambre photographique est portée par un support indépendant, et un manchon sans contacts établit la liaison entre le microscope et la chambre photographique, où se trouve un obturateur central à minuterie.

L'enregistrement des images devant se faire selon un rythme rapide la plaque est inutilisable. Nous avons donc adjoint à la chambre photographique un dispositif permettant l'emploi de bobines de film Standard, et, pour cette étude nous nous sommes servi, en raison de certaines facilités, de bandes de papier sensible enregistreur d'un mètre de long, nous donnant 9 images.

L'éclairage est réalisé par une lampe de projection.

Certains points ont été de réalisation difficile, en effet, dans les conditions d'expérience, lumière dirigée intense, et temps de pose volontairement réduit au strict minimum, il est impossible d'obtenir simultanément la photographie du quadrillage de la cellule et des globules qui s'y trouvent.

Le problème a été résolu en interposant au contact de l'émulsion une « grille » pelliculaire obtenue par photographie sur film de la cellule remplie de liquide de dilution seul.

Cette « grille » n'étant d'ailleurs valable que pour une seule et même cellule, et pour un certain tirage de la chambre.

Dans ces conditions, un certain champ globulaire, photographié plusieurs fois de suite, nous a toujours donné un nombre identique de globules rouges, ceci en dépit de minimales variations de mise au point.

Pour réduire au minimum le temps de prise de vue, la grille a été construite de façon à englober dans un seul champ photographique la surface correspondante à deux fois $1/100$ de millimètre cube, soit 2 rectangles de la cellule de MALASSEZ. Chaque bande nous fournit ainsi $9 \times 2 = 18$ fois $1/100$ de millimètres cubes, il suffit donc d'en utiliser six, pour photographier 100 champs en chiffre ronds : soit 1 millimètre cube d'une même goutte de la dilution étudiée.

Cette opération de prise de vue se fait très rapidement, 25 minutes au plus, entre le moment de la fin de sédimentation des globules rouges, dans la cellule, à la prise du dernier cliché, et l'éclairage ne fonctionne que pendant la moitié de ce temps, il n'y a donc pas d'échauffement inutile de la cellule, pendant les actes préparatoires. Dans ce laps de temps, un opérateur bien entraîné, aurait pu compter à l'œil

1/10 de ce que permet la photographie, et avec une précision bien moindre.

Les photographies exécutées et développées — ce qui est simple — on est en possession de négatifs très lisibles — où figurent quadrillages et globules — et sur lesquels le dénombrement des globules rouges est *aisé et sûr* (voir fig. 1).

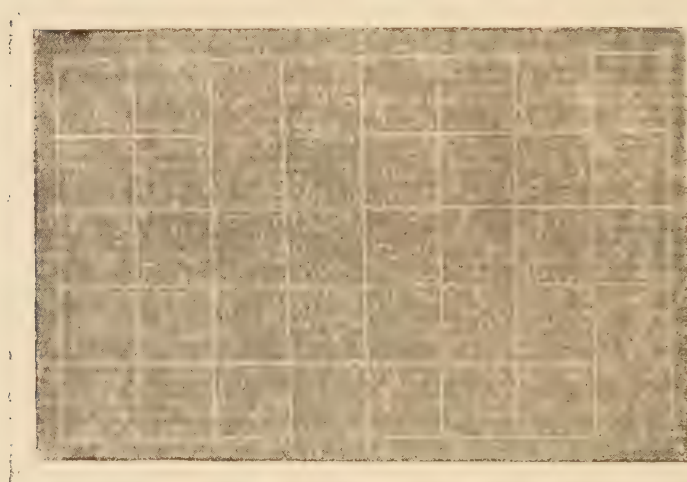


Fig. 1. — Microphotographie d'un champ.

L'épreuve sur papier permet en effet (et non le film) de « cocher au crayon » chaque globule compté et d'éviter ainsi toute omission, ou tout double comptage. De plus, un coup de gomme est vite donné et permet une nouvelle opération de contrôle.

L'ensemble de notre expérimentation est basée sur l'étude de 1.400 microphotographies correspondant chacune à un rectangle de la cellule de MALASSEZ.

Soit à 1/100 de millimètre cube d'une dilution au 1/200 avec du liquide du Dr MARCANO.

Nos numérations d'hématies ont été faites sur des adultes jeunes — d'apparence normale — présentant un temps de saignement et de coagulation normal ; le sang a été prélevé à jeun.

Nous croyons fastidieux de rapporter la totalité de nos expériences qui sont toutes parallèles et nous en donnerons seulement un exemple.

CHAPITRE V

RÉSULTATS

Nous renvoyons au chapitre précédent où figure un modèle de photographie (fig. 1). Il y a ainsi dans le cas du sujet Ch... Bobines 26 à 32, six bandes de 9 champs représentant deux rectangles de MALASSEZ, qui se répartissent sur toute la surface de l'hématimètre.

Voici le schéma de leur répartition réelle sur la cellule (fig 2). Rappelons que c'est à l'obligeance de M^{me} et M. FESSARD que nous devons la plupart des calculs et des courbes qui suivent.

LA MOYENNE ET LES VALEURS QUI S'Y RATTACHENT

La moyenne des 100 champs est de 297,84 ; on utilise pour calculer la dispersion et l'erreur probable une moyenne provisoire de 300.

La dispersion $\sigma = \sqrt{\frac{40.462}{100} - (2,16)^2}$, ou 40.462 représente la somme des carrés des écarts à la moyenne : $\sum (n-M)^2$ le facteur $(2,16)^2$ correspond au

REPARTITION REELLE DES CHAMPS PAR PAIRES
SUR L' HÉMATIMÈTRE .

Film n°	31	30	29	28	27	26
			294	303		
		293	279	268	300	
305	298	298			264	297
298			322	318		314
	281	272	266	276		
281	304			289		270
293		303	286			310
	278	268	284	305		
294	286			290		326
302		262	294			282
	298	281	305	289		
287	293			283		276
300		316	301			256
	307	314	334	314		
326	384			302		282
329		293	306			289
	285	306	303	333		
317	317			301		280
321		306	311			280
	312	301	307	312		
100	330			318		288
champs	300		292	291		265
		323	318	-	301	
	325	298			300	289
-		302	-			267
	295	300	-	313		
-	327			313		277
-						272

Fig. 2.

Serie des nombres	Fréquence	Ecartés $M - n$	Serie des nombres	Fréquence	Ecartés $M - n$
256	1	+ 44	295	1	5
262	1	38	297	1	3
264	1	36	298	4	2
265	1	35	300	4	0
266	1	34	301	4	1
267	1	33	302	3	2
268	2	32	303	3	3
270	1	30	304	1	4
272	2	28	305	3	5
276	2	24	306	3	6
277	1	23	307	2	7
278	1	22	310	1	10
279	1	21	311	1	11
280	2	20	312	2	12
281	3	19	313	2	13
282	2	18	314	3	14
283	1	17	316	1	16
284	2	16	317	2	17
285	1	15	318	3	18
286	2	14	321	1	21
287	1	13	322	1	22
288	2	12	323	1	23
289	4	11	325	1	25
290	1	10	327	3	27
292	1	8	333	1	33
293	4	7	334	1	34
294	3	6	391	1	91

Fig. 3.

carré de la différence entre la moyenne vraie et la moyenne provisoire.

$\sigma = 10,99$ d'où l'on tire l'écart probable

$ep = 0,6745\sigma = 13,49$ en valeur absolue ou 4,53 % en valeur relative.

MODE DE DISTRIBUTION DES VALEURS EXPÉRIMENTALES

Dans le tableau ci-joint figurent : la série des nombres expérimentaux en valeurs croissantes, leur fréquence, et les écarts correspondant à la moyenne provisoire de 300 (fig. 3). Le tableau permet de construire le schéma montrant le mode de distribution des valeurs expérimentales (fig. 4).

Pour faire apparaître ces groupements, les valeurs expérimentales sont groupées autour de points centraux, espacés les uns des autres de cinq unités.

La lecture du schéma est la suivante, pour la valeur 302 par exemple, on lit : Il y a 15 résultats groupés autour de 302, pour la valeur 267 il n'y en a que 5.

L'examen de ce schéma permet de tirer les conclusions suivantes. L'allure générale de la courbe limitant la figure affecte celle de la courbe « en cloche » théorique, et l'on sait que ce mode de groupement se rencontre lorsque les faits obéissent aux lois du hasard.

On constate que les valeurs les plus fréquentes sont groupées autour de la moyenne, et que celles qui s'en écartent sont rares (cas des vals 257-337-392).

Raymond Aubert.

On est donc autorisé à considérer la moyenne d'une expérience comme le chiffre le plus probable d'une série de mesures de numération globulaire.

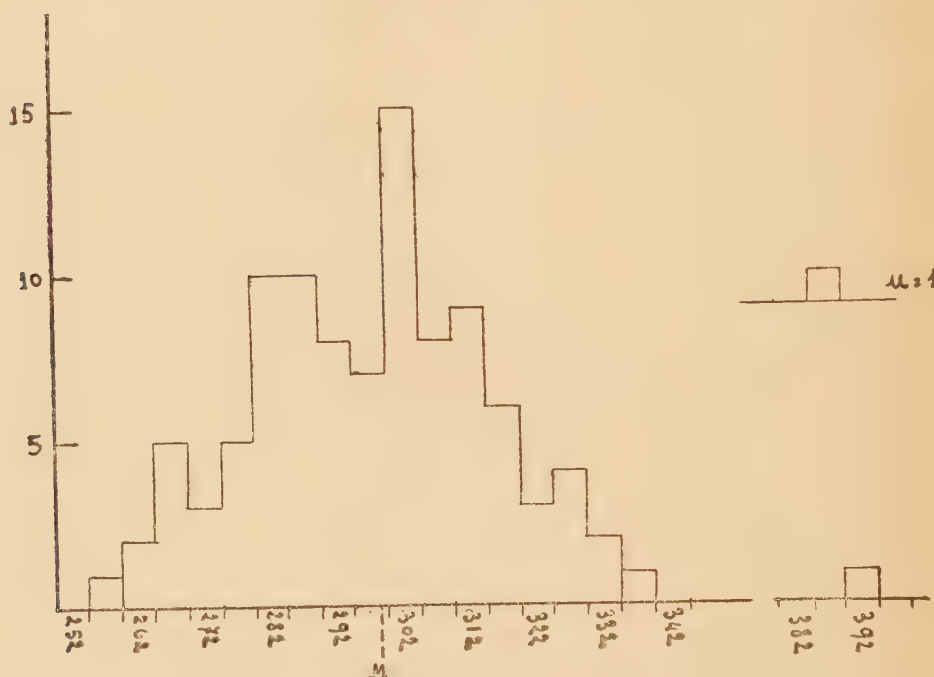


Fig. 4. — Distribution des valeurs expérimentales.

L'IRRÉGULARITÉ DE RÉPARTITION DES GLOBULES ROUGES SUR LA CELLULE.

Celle-ci est évidente dès que l'on examine la série des résultats exposés. Mais il importe avant tout de savoir si elle est purement fortuite et due au seul hasard ou bien si elle relève d'un facteur systématique tel qu'une erreur instrumentale ou d'exécution.

L'étude du calcul des probabilités nous permet d'établir une confrontation entre les résultats théoriques calculés, et ceux établis expérimentalement, et de voir s'il y a accord ou désaccord.

Valeurs de l'écart probable				
n de Mesures Groupes	Val. Exper.		Val. Théor.	
	ABS.	R. %	ABS.	R. %
1	13,49	4,5	13,49	4,5
2	9,50	3,2	9,54	3,2
5 ₁	8,37		6,03	2,02
5 ₂	6,66	2,23	6,03	2,02
10	4,32	1,45	4,27	1,43
50			1,91	0,6
100			1,35	0,4

Fig. 5.

Dans le tableau ci-dessus (fig. 5) figurent les valeurs de l'écart probable. Trouvé expérimentalement, et calculé, dans le cas de 1 mesure, ou de la moyenne vu 2-5-10-50-100 mesures.

Les valeurs sont données en valeurs : Absolues et relatives. Celles qui se rapportent aux résultats donnés par le calcul ont été obtenues par l'application de la formule

$$ep_M = 0,6745 \times \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

erreur probable sur une moyenne de N mesures.

On voit que la concordance est satisfaisante, sauf en 5_1 où le groupement des valeurs fut fait selon l'ordre des séries et non au hasard comme on doit toujours le faire (comme en 5_2), le résultat 5_1 , doit être rejeté.

Cet accord entre les résultats est encore bien mis

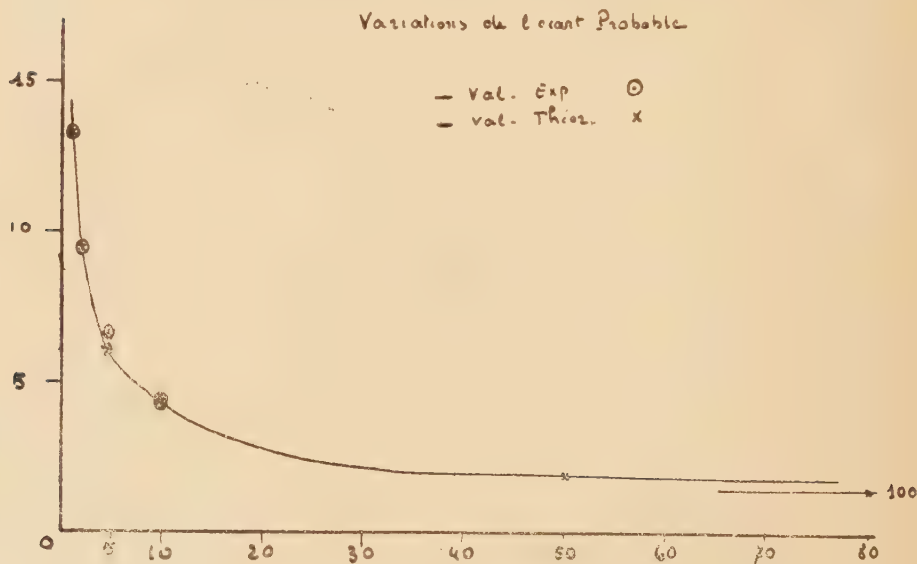


Fig. 6.

en évidence par la courbe ci-contre (fig. 6) où sont portées les valeurs expérimentales et théoriques.

On voit donc une fois de plus, que dans les conditions d'expérience, l'irrégularité de répartition des globules rouges sur l'hématimètre obéit aux lois du hasard.

PROBABILITÉS DES MESURES EFFECTUÉES. — Dans

ces expériences l'écart probable est de 4,5 % avec une probabilité de 50 %, c'est-à-dire que ce résultat donné comporte des chances égales d'être affecté d'une erreur — inférieure — ou — supérieure à 4,5 %.

En d'autres termes, dans 50 cas sur 100, l'erreur sera inférieure à 4,5 % — mais on ignore complètement à combien peut s'élever la grandeur des erreurs commises dans les 50 autres cas — sur 100.

C'est, on le voit, une probabilité assez faible, malgré une bonne précision des mesures effectuées.

En médecine ce sont les valeurs de probabilité comprises entre 75 % et 99 % qui sont les plus intéressantes. Nous allons aborder leur étude.

PASSAGE A D'AUTRES PROBABILITÉS ETUDE DES COURBES THÉORIQUES ET EXPÉRIMENTALES

L'étude des courbes théoriques relatives à la distribution des valeurs montre que l'écart probable est lié — ou correspond — à une probabilité de 50 % (Voir plus haut.)

Cette courbe théorique dite courbe « en cloche » est tracée en portant en abscisses les divers nombres de globules qu'on peut trouver, et en ordonnées, les fréquences correspondant théoriquement, d'après le calcul des probabilités, à chacune de ces valeurs :

Portons de part et d'autres de la moyenne une ab-

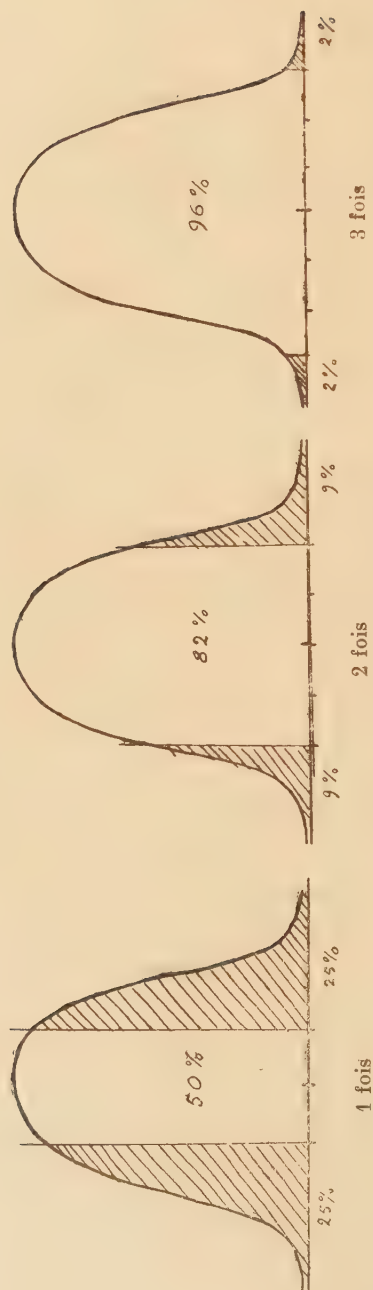


Fig. 7. — Courbe des Probabilités.

En abscisses : les valeurs observées ;
En ordonnées : le nombre de chacune.

Fréquence des divers Ecart à la Moyenne
mesurée par la surface limitée par la courbe.

l'erreur probable

scisse égale à l'écart probable (ep) en plus ou en moins, et, élevons les perpendiculaires en ces points.

Celles-ci divisent la surface de la courbe en 3 zones — celle qui est comprise entre les 2 écarts a une surface égale à la somme des deux autres situées en dehors de ces limites — et l'on dit que l'écart probable correspond à une probabilité de 50 %, car la surface ainsi délimitée par lui est de 50 % de la surface totale de la courbe.

Portons, maintenant de part et d'autre de la moyenne. 2 fois l'é. p. en + ou en — et nous verrons que la zone comprise entre ces nouvelles limites englobera 82 % de la surface totale, ce qui correspond à une probabilité de 82 %. Si l'on prenait comme valeur des erreurs, 3 fois celle de l'écart probable, la probabilité serait pour la même raison de 96 % (fig. 7).

Considérons maintenant la courbe tracée expérimentalement — au moyen des chiffres rapportés dans le tableau des résultats (fig. 3). Cette courbe nous donne le % de mesures comportant une erreur inférieure à un écart à la moyenne donné (ceci en valeur absolue ou relative). C'est, en somme, une courbe donnant la valeur des erreurs statistiques en fonction de diverses probabilités (fig. 8).

Nous voyons que pour un écart relatif de 4,5 %, la probabilité est de 50 % ce qui correspond bien à la définition de l'écart probable.

Pour 2 fois l'é. p. soit 9 %, nous trouvons une probabilité de 86 %; enfin, pour 3 fois l'é.p. soit 13,5 %, de 98 % (il existe un léger décalage, la

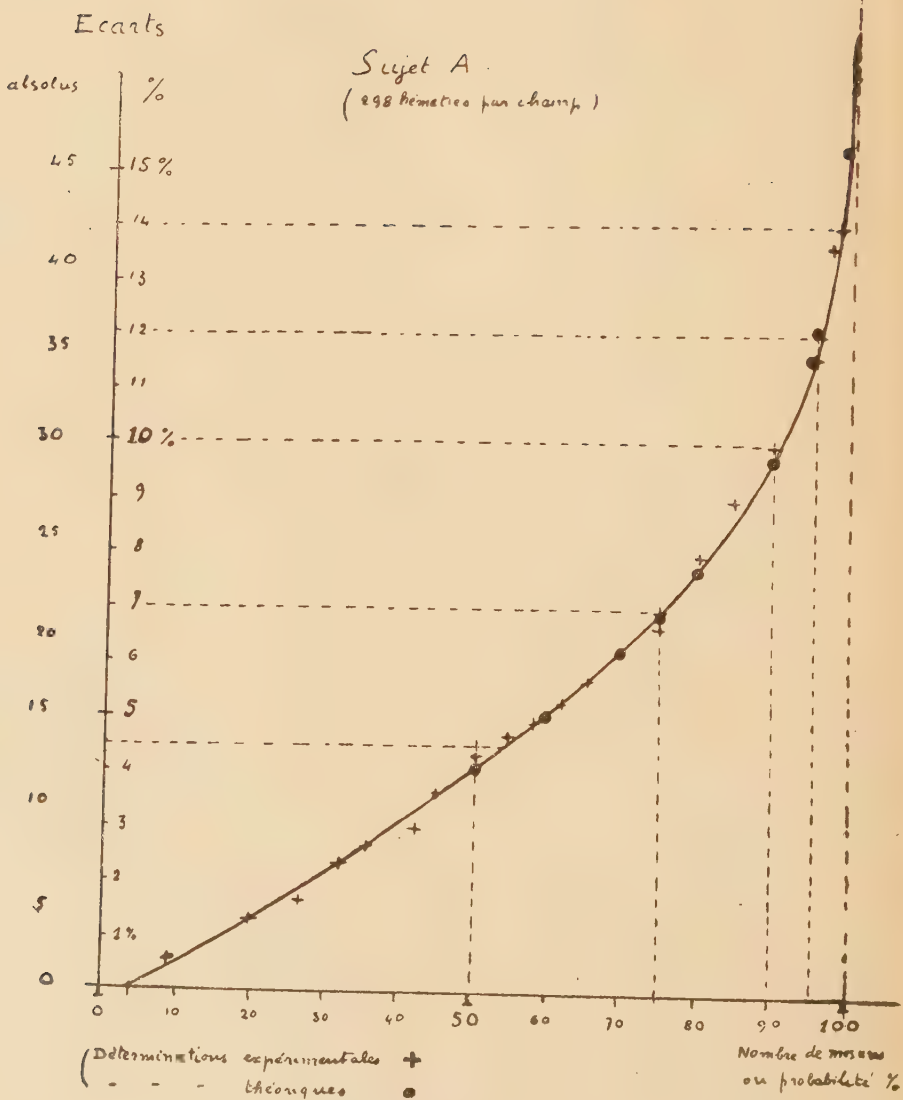


Fig. 8.

valeur expérimentale de la probabilité est de 2 % supérieure à la valeur théorique).

Il existe donc une concordance très satisfaisante entre les faits expérimentaux et la théorie des probabilités. Cet accord se vérifie avec une latitude de 1,5 % environ pour l'ensemble des expériences.

On peut utiliser pour déterminer les rapports existants entre les erreurs statistiques et les probabilités, les courbes expérimentales ou théoriques et des tableaux (fig. 9).

L'étude de la courbe expérimentale nous permet de voir qu'une probabilité de 90 % entraîne pour les numérations globulaires faites selon notre méthode, une erreur statistique de 10 %. Ce résultat est à retenir il nous servira par la suite.

COMPARAISON ENTRE LES RÉSULTATS FOURNIS PAR LA MÉTHODE DU CONTRÔLE PHOTOGRAPHIQUE DES NUMÉRATIONS ET LA MÉTHODE CLASSIQUE PAR OBSERVATION VISUELLE AVEC LE COMPTE GLOBULE DE MALASSEZ. — Pour nous faire une idée de ces différences, nous avons procédé de la manière suivante.

Un champ de l'hématimètre est photographié. Dans un premier groupe d'expériences, une série d'observateurs entraînés aux numérations globulaires dénombrent les globules rouges en regardant la microphotographie, placée dans un angle de vue correspondant à celui sous lequel serait vu le même champ, au microscope — puis dans une deuxième expérience —

TABLE DES PROBABILITES NORMALES

Pourcentage des erreurs inférieures	Valeur de l'erreur	Pourcentage des erreurs supérieures
50 %	1	50 %
55	1,1200	45
60	1,2478	40
65	1,3856	35
70	1,5366	30
75	1,7055	25
80	1,9000	20
85	2,1343	15
90	2,4387	10
95	2,9058	5
96	3,0449	4
97	3,2174	3
98	3,4490	2
99	3,8189	1
100	∞	0

Fig. 9. — Ici les erreurs sont calculées en fonction de l'erreur probable en plus ou en moins, prise pour unité.

on détermine le nombre réel de globules rouges existant sur cette surface en « cochant » les globules un à un.

Nous avons soumis 4 champs différents à une série de sept observateurs. Voici nos conclusions :

1^o Le dénombrement à l'œil donne des résultats, dont la grandeur est inférieure au nombre réel des globules rouges existant sur la photographie.

2^o Le pourcentage de cette erreur (ou coefficient de correction) est de l'ordre de :

5, %	pour	300	globules rouges	
3,5 %	—	200		—
1,5 %	—	100		—

existant réellement dans le champ.

Si l'on veut que le résultat fourni par une numération globulaire faite selon la méthode visuelle, corresponde plus exactement au nombre réel des hématies, il faut donc faire la correction ci-dessus mentionnée.

Il est bien entendu que cette recommandation n'a qu'une valeur toute relative, en raison des variations individuelles importantes, et même des variations momentanées chez un même observateur.

Ce qui est assuré, c'est la tendance générale des observations, faites par cette méthode, de donner un chiffre de globules rouges, légèrement sous-estimé, surtout en ce qui concerne les sang riches.

Nous avons d'ailleurs été surpris de la richesse des

sangs normaux soumis à nos investigations, les chiffres de 6 à 6,5 millions étant assez fréquents, et c'est une question que nous nous proposons d'éluider.

CHAPITRE VI

CONSÉQUENCES PRATIQUES

Notation des mesures

Nous avons déjà signalé que la valeur numérique d'un résultat de numération globulaire devrait obligatoirement être accompagné des chiffres indiquant :

1^o la précision technique de sa mesure, tenant au matériel et à l'opérateur.

2^o l'erreur statistique tenant au hasard de l'échantillonnage.

3^o la probabilité d'exactitude, indiquant en pourcentage , les chances qu'il y a pour que le nombre trouvé représente bien le nombre réel de globules contenus dans la partie de sang prélevée.

On peut en clinique, considérer presque comme une certitude, une probabilité de l'ordre de 90 % telle que le résultat obtenu ait 90 chances sur 100 de se trouver réalisé.

Ainsi c'est à ce dernier chiffre que nous nous sommes arrêtés, et les résultats que nous donnerons, le seront avec 90 chances contre 100.

Il est bien évident qu'il n'y a pas lieu de donner plus de chiffres significatifs que ne le permet la précision obtenue. Si elle est de l'ordre de 10 %, les deux premiers chiffres de gauche sont largement suffisants dans les numérations d'hématies.

Précision des numérations faites selon la méthode classique

La plupart des opérateurs, à Paris, comptent les globules rouges sur des dilutions au 1/200, dont ils numèrent 4 rectangles de 1/100 de millimètre cube sur l'hématimètre de MALASSEZ.

La majorité des numérations portent sur des chiffres voisins de 4.000.000 d'hématies. Ce qui correspond à la dilution au 1/1200 et pour un rectangle de l'hématimètre à 200 globules.

L'erreur statistique sur un rectangle comprenant 200 globules, doit donc être $\sqrt{\frac{300}{200}}$ fois plus grande que dans nos expériences portant sur des sangs riches donnant 300 éléments par rectangle.

D'autre part, si nous comptons 4 rectangles au lieu d'un seul — à condition encore de les prendre au hasard, et non côte à côte, l'erreur statistique a diminué de moitié (soit divisée par $\sqrt{4}$).

Nous avons vu que par la méthode photographique on trouve avec une probabilité de 90 % une erreur statistique de 10 %, donc l'erreur statistique des numérations faites dans les conditions indiquées, c'est-à-dire : observation visuelle de 4 champs d'une dilu-

tion à $1/200$ pour un sang de 4.000.000 de globules rouges est de

$$10 \% \times \sqrt{\frac{300}{200}} \times \frac{1}{2} = 6,1 \% \quad \text{soit} \quad 6 \%$$

avec une probabilité de 90 %.

Il faut ajouter à cette erreur statistique, les erreurs instrumentale et opératoire dont la somme peut atteindre 5 %.

L'erreur totale, avec une probabilité de 90 % est donc de 11 %. Rappelons qu'il faut en outre faire la correction dont nous avons déjà parlé en raison de la sous-estimation propre à l'observation visuelle, d'environ 3,5 %.

Pour la comparaison entre deux examens de sang faits successivement chez un même individu dans des laboratoires différents, avec dénombrement visuel, il faudra tenir compte du fait que les erreurs d'ordre instrumental et statistique peuvent s'ajouter ; pour l'erreur de dénombrement, habituellement toujours « en moins », il est permis de ne la compter qu'une seule fois pour les deux opérations. Donc pour qu'il existe une variation réelle du nombre des hématies les résultats trouvés doivent différer d'une quantité supérieure à la somme de deux fois l'erreur instrumentale, plus deux fois l'erreur statistique, plus une fois l'erreur de dénombrement.

Dans les conditions définies plus haut ce total atteint au maximum :

$$2 \times 5 + 2 \times 6 + 3,5 = 25 \% \text{ environ avec une probabilité de } 90 \%$$

Dans le cas de numérations faites *par un même opérateur* avec le même matériel, les erreurs instrumentales s'annulent à peu près et les erreurs de dénombrement jouant en grande partie dans le même sens, nous croyons que leur total ne dépasse pas 3 %. Mais l'erreur statistique 2×6 % reste inchangée.

On pourrait donc alors considérer comme réelle, avec une probabilité de 90°, une variation atteignant seulement 15 % de la moyenne des nombres d'hématies trouvés.

Conditions pour améliorer la méthode classique par observations visuelle

D'abord au point de vue erreur statistique il faudrait compter un nombre de champs plus grands. La courbe de l'écart probable (fig 6) nous montre qu'on gagne beaucoup en exactitude quand le nombre des champs examinés s'élève jusqu'à 10 ; à partir de 20 champs, les erreurs dues au hasard de l'échantillonnage diminuent peu.

C'est donc sur dix à vingt champs qu'il convient de faire la numération.

Pour dix champs l'erreur statistique, avec probabilité de 50 %, tombe de 4,5 à 1,45 % environ pour des sangs riches en hématies, et à moins de 2 % pour des sangs contenant 4.000.000 de globules rouges par millimètre cube.

Y a-t-il intérêt à diluer davantage le sang pré-

levé ? En apparence oui, pour faciliter le compte des hématies. Nos recherches montrent en effet que la précision du dénombrement visuel est à peu près proportionnelle à la dilution (Voir plus haut). Si on augmente la dilution on augmente les erreurs statistiques proportionnellement à la racine carrée du taux de dilution. Ainsi en passant de la dilution à $1/200$ à $1/400$, l'erreur de dénombrement visuel passe de 3,5 à 1,7 % et l'erreur statistique de 6,1 à 8,6 % pour une même probabilité de 90 %.

L'erreur statistique qui n'atteignait pas le double de l'erreur de dénombrement devient cinq fois plus grande qu'elle. Le gain de précision obtenu par une lecture plus facile est donc complètement annulé par les hasards, de la répartition des hématies sur la cellule. Il n'y a donc aucun intérêt à prendre une autre dilution que le deux centième.

Ces recherches que nous venons d'exposer aboutissent comme ultime déduction à la proposition suivante.

La précision maxima possible en pratique hématologique sera obtenue par un opérateur travaillant toujours avec les mêmes instruments, numérant quinze champs de $1/100$ de millimètres cubes d'une dilution à 1 pour 200. Dans ces conditions il pourra considérer comme réelle, avec une probabilité de 90 %, toute variation, du nombre des hématies atteignant 10 %.

Pour des numérations faites, dans les mêmes conditions techniques, mais par des opérateurs diffé-

rents avec instruments distincts, une variation ne sera significative avec probabilité de 90 %, que si elle dépasse nettement 20 %.

La numération sur photographie permet d'améliorer légèrement ces résultats, surtout en facilitant l'examen d'un plus grand nombre de champs.

Comme on ne peut supprimer entièrement l'erreur opératoire, il ne paraît pas intéressant de compter plus de trente centièmes de millimètres cubes. On peut espérer par ce moyen diminuer encore de 5 % environ les erreurs commises, mais il semble bien qu'il soit impossible de faire mieux, pour une probabilité de 90 %.

CONCLUSIONS

Dans les numérations hématologiques, les causes d'erreurs appartiennent à deux groupes bien distincts.

D'une part, les erreurs opératoires tenant à l'imperfection des instruments, à l'exécution même de la numération.

De l'autre, les erreurs statistiques, tenant aux irrégularités inévitables de répartition des globules dans la cellule hématimétrique.

L'existence de ce dernier facteur entache le résultat de la numération de l'élément *d'incertitude commun à tous les dénombrements statistiques*. Pour une technique donnée l'erreur opératoire est limitée, et son maximum peut être déterminé avec certitude.

L'erreur statistique n'a théoriquement pas de limites, mais les différentes valeurs qu'elle peut prendre n'ont pas une probabilité égale.

Avec le résultat d'une numération globulaire il convient donc d'indiquer la précision opératoire, l'erreur statistique et sa probabilité.

L'emploi de la photographie pour le dénombrement des globules rouges, élimine à peu près complètement les causes d'erreur opératoire et rend

possible la numération rapide de toute la surface de l'hématimètre.

Elle permet d'établir la répartition des hématies dans la dilution de sang.

Elle montre que dans les conditions opératoires habituelles, les lois du hasard s'appliquent intégralement.

Nos recherches dans ce domaine nous ont montré que la méthode opératoire habituelle avec l'appareil de MALASSEZ : dilution au $1/200$, décompte par observation visuelle de quatre rectangles de $1/100$ de millimètre cube, comporte les erreurs suivantes :

— erreurs instrumentales, 5 % en plus ou en moins ;

— erreurs statistiques pour quatre champs : 6 %, avec une probabilité de 90 %.

L'ensemble des erreurs est donc inférieur à 11 % en plus ou en moins dans 90 cas sur 100 (soit de l'ordre de 500.000 globules rouges en plus ou en moins pour un sang normal). Etant bien entendu que nous ignorons la valeur de l'erreur maximale possible dans les 10 autres cas sur 100.

Le résultat numérique trouvé par la méthode d'observation visuelle est en général inférieur de 3,5 % à la valeur réelle du résultat tel que le donnerait la méthode photographique ; il faut donc corriger ce résultat en l'augmentant de 3,5 % de sa valeur.

En clinique : pour les numérations effectuées dans les conditions indiquées, il faut, pour être en droit

de conclure à l'existence d'une variation réelle du nombre de globules rouges entre deux numérations successives, que la différence entre les deux chiffres trouvés soit plus grande que la somme des erreurs commises sur chacun d'eux.

Dans l'exemple précédent, il faut que les variations dépassent environ 15 % de la valeur moyenne des nombres obtenus par un même opérateur, avec les mêmes instruments.

La méthode photographique permet de diminuer sensiblement les erreurs d'ordre statistique en facilitant la numération d'un plus grand nombre de champs.

Vu :
Le Doyen,
G. ROUSSY.

Vu :
Le Président de la Thèse,
FIESSINGER.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
CHARLÉTY.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ARMAND, DELILLE et LAUNOY. — *Annales I. P.*, 1911, p. 222.
Action stabilisatrice du formol sur les hématies.
- AUBERTIN (Ch.). — Auto agglutination des Hématies. *P. Médicale*, n° 26, 1929.
- AYNAUD. — *Soc. Biol.*, 18 juin 1910. Numération des hématoblastes.
- BENSAUDE (R.). — Examen clinique du Sang. Rueff., 1900.
- BOCAGE (A.). — L'incertitude des numérations hématologiques. *Soc. d'Hématologie*, juillet 1934.
- BOCAGE (A.) et AUBERT (R.). — Le hasard dans la numération des hématies. I. Technique d'étude expérimentale. *Soc. d'Hématologie*, juillet 1934.
- BOCAGE (A.), M. et M^{me} FESSARD, AUBERT (R.). — Le hasard dans la numération des hématies. II. Premiers résultats expérimentaux. *Soc. d'Hématologie*, juillet 1934.
- DOGNON (A.). — *Précis de Physico- Chimie Médicale*, 1931.
- EXTON. — A new Method of counting red blood cells. *The Journal of american Med. Ass.*, XCIV, 30, 1573.
- EXTON. — Scopometry. *Arch. Path.*, 5, 49 à 65, 1928.
- HALBERT (L.), DUNN. — Application of Statistical Methodes in Physiology. *Physiological Reviews*, IX, 1929, 275 à 398.
- HAYEM (G.). — Du Sang, Masson, 1898.
- HIHMAIR. — *Med. Klin.*, n° 30, 21/6/33. Hématimètre pour numération.
- LANGERON. — *Précis de microscopie*, 1921.
- MALASSEZ (L.). — De la numération des globules rouges du sang. Delahaye, 1873.
- MARCAUDIER, BIDEAU, DUBREUIL. — Application de la Photométrie à la numération des globules rouges. *Arch. Med. et Pharm. Navale*, n° 2, juin 1929.

- MARCANO. — Action du Formol sur les globules rouges du sang. *Arch. Med. Exp.*, 1899, vol. XI, p. 434.
- NEWHAM et HARVEY. — Numérations de globules rouges. *Journal Tropical med. an Hyg.*, XXXI, 2 avril 1928, 77-78.
- PAVIOT (J.), JOSSEAUD (A.), CHEVALLIER (R.). — *Soc. Biol.*, 14 nov. 1930, t. CV, p. 401. Nouveau procédé de numération globulaire par prise de sang I. V.
- ROSS (R.) et STOT (W.). — *Ann. of Trop. med. and Parasitology. Tables of statistical errors*, 1911-12, p. 347.
- SELLHEIM. — Verbesserung der Blutuntersuchung. *Klin. Wochensh.*, IV, 21 oct. 25, 204952.
- THOMSEN (Oluf). — Dénombrement direct des plaquettes. *Soc. Biol.*, t. LXXXIII, p. 505, 1920.
- THOMSON (David). — A new Blood pipette for estimating the number of leucocytes and parasites per cubic mm. *Annals of trop med. and Parasito.*, p. 471, 1911-12.
- THOMSON. — Methode simplifiée de numération globulaire. *Medic. Press.*, CLXIX (New Serie CXVIII, 9 juillet 1924, 26-7.)
- VIGNERON (H.). — *Manuel des calculs de Laboratoire*, 1931, Masson.
- WIDAL, ABRAMI, BRULÉ. — *Soc. Biol.*, 1908, t. LXIV, p. 655. Auto Agglutination des hématies dans ictères hémolytiques.

